Aus dem physiologischen Institut der Universität Heidelberg.

Direktor: Prof. Dr. A. Kossel.

Ist die Nuclease mit dem Trypsin identisch?

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Grossh. Bad. Ruprecht-Karls-Universität zu Heidelberg

vorgelegt von

Fritz Sachs

aus **Kattowitz.**

Heidelberg.

Universitäts-Buchdruckerei von J. Hörning.

1905.

Gedruckt mit Genehmigung der medizinischen Fakultät
Heidelberg.

Dekan: Geh. Hofrat Prof. Dr. A. Edler von Rosthorn.
Referent: Professor Dr. A. Kossel.

Meinen geliebten Eltern!

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40153303_0149

Aus dem physiolog. Institut der Universität Heidelberg.
Direktor: Prof. Dr. A. Kossel.

Ist die Nuclease mit dem Trypsin identisch?

Von

Fritz Sachs.

Bis vor etwa 30 Jahren fehlte von der chemischen Zusammensetzung und dem Stoffwechsel des Zellkernes fast jegliche Kenntnis. Vieler Jahre mühevoller Arbeit bedurfte es, um den verhältnismässig tiefen Einblick zu gewinnen, der in uns heute schon so klare Vorstellungen von jenen Vorgängen zu erwecken im Stande ist. Es finden sich zwar auch aus weiter zurückliegender Zeit diesbezügliche, sehr wertvolle Angaben in der Literatur, deren wahre Bedeutung aber von den damaligen Beobachtern noch nicht richtig gewürdigt werden konnte. Bereits im Jahre 1865 fand Béchamp[1]), dass, wenn er Hefe unter Vermeidung der Fäulnis der Einwirkung des Wassers aussetzte, Phosphorsäure in Lösung überging. Schützenberger[2]), welcher die Béchamp'schen Versuche aufnahm, bestätigte dieselben und konnte ausserdem in dem nach der Digestion erhaltenen wässrigen Auszug

1) Comptes rendus des séances de l'Académie des sciences 1865. Bulletin de la société chimique de Paris XXI.

2) Comptes rendus des séances de l'Académie des sciences 1874.

dieselben Körper nachweisen, welche durch Kochen in Lösung übergehen, nämlich eine gummiähnliche Substanz, Leucin, Tyrosin, Xanthin, Guanin und Hypoxanthin (angeblich auch Carnin). Nach seiner Ansicht würden diese Stoffe in der Hefe durch ein ähnliches Agens vom Eiweiss abgespalten, wie in den tierischen Geweben, und man bezeichnete diesen Vorgang als „Selbstgährung" der Hefe. An irgend einen Zusammenhang, der bei seinen Versuchen entstandenen Zersetzungsprodukte mit den bereits vor einigen Jahren von Miescher[1]) entdeckten Nucleïnen dachte Schützenberger natürlich noch nicht. Auch Miescher selbst erkannte die genetischen Beziehungen des Nucleïns zu den genannten Basen nicht. Die Bedeutung der Schützenberger'schen Befunde konnte daher erst erhellen, als A. Kossel[2]) in dem Nucleïn die Muttersubstanz der Xanthinkörper erkannte. Aus diesem Befunde ergab sich schon ohne weiteres, dass bei der von Schützenberger untersuchten „Selbstgährung" eine Zersetzung des Nucleïns vor sich gegangen sein musste. Kossel[3]) konnte dann auch die Schützenberger'schen Versuche insofern bestätigen und ergänzen, dass er in Hefe, die er unter Wasser bei Körpertemperatur digerieren liess, eine Verminderung der Menge der Nucleïnphosphorsäure und somit eine Zersetzung des Nucleïns konstatierte. Er brachte diese Erscheinungen mit der vom Pathologen beobachteten Auflösung des Zellkernes in Zusammenhang.[4])

---

1) Med. chem. Unters., herausg. von Hoppe-Seyler.

2) Zeitschr. für physiol. Chem., Bd. IV, Bd. V.

3) „ „ „ „ Bd. VII, S. 14.

4) A. Kossel, Die Nucleïne und ihre Spaltungsprodukte. Strassburg 1883.

Aus Untersuchungen von Lehmann[1]) geht hervor, dass bei diesen Autodigestionsprozessen nicht nur eine Abspaltung der Basen erfolgt, sondern dass auch die abgespaltenen Basen weiter verändert werden. Die Menge des Hypoxanthin wird allmählich geringer, während die des Xanthin anwächst, was einer Oxydation der Nucleïnbasen entsprechen würde. Diese Resultate wurden freilich noch mit sehr unvollkommenen Methoden zur Trennung der Basen erhalten.

Während bis 1880 derartige Beobachtungen über spontan verlaufende Umsetzung der Nucleïnstoffe nur von der Pflanzenzelle existierten, konnte Salomon[2]), ausgehend von der Erfahrung, dass das Hypoxanthin sich nur im Leichenblut, nicht im Aderlassblut vorfand, in diesem Jahre ähnliche Befunde an tierischen Organen erheben. Er fand nämlich, dass man aus Leber und Muskeln, wenn man diese Organe 4—24 Stunden bei Zimmertemperatur liegen lässt, weit mehr Hypoxanthin darstellen kann, als nach frischer Verarbeitung derselben erhalten wird und sprach auch hier bereits die Vermutung aus, dass es sich dabei um die Wirkung eines die Zellen überlebenden Fermentes handelt, das, wie Säure, die Xanthinkörper abspaltet. Die Richtigkeit dieser Vermutung wurde erst wahrscheinlich gemacht durch die Untersuchungen Salkowskis[3]), welcher hauptsächlich durch seine Autodigestionsversuche die Fortschritte auf diesem Gebiete förderte. Salkowski setzte systematisch den in Selbstgährung befindlichen Organen

1) Zeitschr. für physiol. Chem., Bd. IX.
2) Arch. für Phys. und Anat., Physiol. Abt. 1881, S. 361.
3) Zeitschr. für physiol. Chem., Bd. XIII, S. 506.
„ „ klin. Med., Bd. XVII, Suppl.
Centralbl. für die med. Wissensch. 1889, Nr. 13.

Antiseptika zu, ähnlich wie dies Kühne bereits früher bei seinen Versuchen über die Trypsinverdauung getan hatte, und wie dies wohl auch in einzelnen Fällen schon von Schützenberger ausgeführt war. Indem er Presshefe unter Chloroformwasser digerieren liess, fand er, ebenso wie Schützenberger, dass dabei Leucin, Tyrosin und andere Stoffe auftraten, und stellte fest, dass das Nucleïn der Hefe ganz oder bis auf einen geringen Bruchteil gespalten wurde. Aus seinem Kontrollversuch, bei dem nach Sterilisation des Gemisches diese Wirkung nicht eintrat, schliesst Salkowski, dass es sich hier um ein Ferment handelt. Es waren zwar auch hier Nucleïnbasen in Lösung übergegangen, aber nur in latenter Form vorhanden, sodass sie regelmässig erst nach dem Kochen mit Säuren durch ammoniakalische Silberlösung gefällt werden konnten. Dies war zu erwarten nach den früheren Beobachtungen von A. Kossel[1]), welcher gefunden hatte, dass gelöste Nucleïnsäure oder Thyminsäure die Ausfällung der Basen durch ammoniakalische Silberlösung hindert. Sobald die in Lösung befindliche Nucleïnsäure durch Kochen mit Säuren oder durch Fermente zerstört wird, werden die Basen durch das genannte Reagens nachweisbar oder „manifest".

Zu ähnlichen Resultaten wie Salkowski gelangten dann in den folgenden Jahren Schwiening[2]), Biondi[3]), Hahn und Geret[4]), Fr. Müller[5]), Kutscher[6]).

---

1) Zeitschr. für physiol. Chem., Bd. XXII, S. 81.
2) Virch. Arch., Bd. 136, S. 444.
3) „ „ Bd. 144, S. 373.
4) Zeitschr. für Biologie, Bd. XL, S. 117.
5) Verhandlungen d. naturf. Ges. in Basel, Bd. 13, S. 308.
6) Zeitschr. für physiol. Chem., Bd. XXXII, Bd. XXXIV.

Hahn und Geret konnten bei Digestion des Buchner'schen Hefepresssaftes Phosphorsäure und die Xanthinkörper als Abbauprodukte nachweisen und somit den Beweis für die Existenz eines von der Hefezelle abtrennbaren Enzyms erbringen. Dieselben Beobachter fahndeten in ihrer Verdauungsflüssigkeit neben den genannten Zersetzungsprodukten nach Albumosen und Peptonen, konnten aber von ersteren nur äusserst geringe Mengen nachweisen, während letztere überhaupt fehlten. Leucin und Tyrosin wurden gefunden. Diese Tatsache schien den Autoren zur Charakterisierung des in Frage kommenden Fermentes sehr geeignet, und so glaubten Hahn und Geret dieses sowohl vom Pepsin, wie vom Trypsin wohl unterscheiden zu müssen, zumal sie nach Einwirkung dieser beiden Fermente auf den Hefepresssaft die Biuretreaktion in für Peptone charakteristischer Weise erhalten konnten. Auch Biondi[1]) hatte schon zu dieser Frage bei seinen Beobachtungen über die Autodigestion von tierischen Organen Stellung genommen und erklärte entgegen der Ansicht Neumeisters die Zersetzungsvorgänge nicht durch die Anwesenheit des Trypsins, sondern eines besonderen proteolytischen Fermentes. Kutscher[2]) hingegen, der bei seinen Versuchen über Hefedigestion als Spaltungsprodukte Guanin, Adenin, Leucin, Tyrosin, Ammoniak, Histidin, Arginin, Lysin, Asparaginsäure, sowie eine Substanz von der Formel $C_8H_6N_4O_4$, bei der Autolyse von Kalbsthymus Purinbasen, Lysin und Ammoniak fand, hielt das in Frage kommende Ferment für ein tryptisches. Nur meinte er, dass die Spaltung weitergegangen wäre.

---

1) Virch. Arch., Bd. 144, S. 373.

2) Zeitschr. für physiol. Chem., Bd. XXXII, Bd. XXXIV.

Es hat sich weiterhin gezeigt, dass nicht nur unter den künstlichen Versuchsbedingungen der Autodigestion, welche ja allerdings die natürlichen nachzuahmen bestrebt sind, sondern auch im Tierversuch eine Zerlegung des Nucleïnsäuremoleküls stattfindet. Dies bewies Gumlich[1]), indem er beim Hunde nach Nucleïnsäureverfütterung eine Vermehrung der freien Phosphorsäure im Harn feststellte, und A. Neumann[2]) konnte sein Resultat bestätigen. Es musste also durchaus der Mühe lohnen, die dabei in Betracht kommenden Vorgänge eingehender zu studieren.

Dass es sich um eine Fermentwirkung handelt, war ja, wie aus den angeführten Tatsachen hervorgeht, sicher erwiesen. Ueber die Natur des Fermentes war aber noch keine Klarheit gewonnen. In dieser Hinsicht sind übrigens einige Angaben in der Literatur, welche sich auf die Wirkung von Trypsin und Pepsin auf die Nucleïnstoffe beziehen, von Bedeutung. Popoff[3]) fand im Jahre 1894, dass bei der Verdauung von Thymusbrei durch Pepsin nur ganz geringe Mengen Nucleïn in Lösung gehen, bei der Verdauung durch Pankreatin von Witte hingegen beträchtliche Mengen, wie er durch die quantitative Bestimmung des Phosphors in der Verdauungsflüssigkeit ermittelte. Dabei war das Nucleïnsäuremolekül noch nicht zersprengt, was aus dem Nachweis des Phosphors und der Nucleïnbasen im Gerbsäureniederschlag hervorging.

Die Untersuchungen Popoffs wurden im Jahre 1896 von Milroy[4]) fortgesetzt. Dieser studierte die Einwirkung von Pepsin und Trypsin auf Nucleïnstoffe und fand, dass sowohl Pepsin wie Trypsin

1) Zeitschr. für physiol. Chem., Bd. XVIII.
2) Arch. für Phys. und Anat., Physiol. Abt. 1898.
3) Zeitschr. für physiol. Chem., Bd. XVIII.
4) Zeitschr. für physiol. Chem., Bd. XXII.

im Stande sind, die aus Thymus, roten Blutkörperchen des Vogelblutes und Pankreas dargestellten Nucleïnkörper in Lösung überzuführen. Hierbei tritt nur eine äusserst geringe Abspaltung von Phosphorsäure aus den gelösten Stoffen ein. Bei der Pepsinverdauung des Thymusnucleïns wurde nicht mehr als 8,7 % der in Lösung befindlichen Phosphorsäure als Orthophosphorsäure vorgefunden, eine Abspaltung, die wohl erwartet werden musste, da die Nucleïnstoffe sich bekanntlich in saurer Lösung leicht spontan zerlegen. Nach Trypsinverdauung desselben Nucleïnstoffes war nur 8,37 % des abgespaltenen Phosphors in Form der Orthophosphorsäure vorhanden. Bei der Pepsinverdauung des aus den Kernen der Vogelbluterythrocyten dargestellten Nucleïns betrug die Menge der durch Pepsin abgespaltenen Orthophosphorsäure nur 15,7 % des gesamten gelösten Phosphors. Nur in einem Versuch (Trypsinverdauung der Kernsubstanz des Entenblutes) war die Menge der abgespaltenen Orthophosphorsäure abnorm hoch (47 %); im Übrigen ergab sich das Resultat, dass die genannten Nucleïnverbindungen durch Pepsin und Trypsin in Lösung übergeführt werden, ohne eine wesentliche Spaltung zu erleiden. Dieses Resultat wurde dann noch dadurch bestätigt, dass Milroy die Nucleïnsäure unter den gelösten Stoffen durch ihre eiweissfällende Wirkung nachweisen konnte und weiterhin durch Untersuchung des bei der Verdauung zurückgebliebenen Restes. Seine Zusammensetzung hatte sich nicht geändert; die Bestandteile des Nucleïns waren also in demselben Verhältnis in die Lösung übergeführt worden, in welchem sie ursprünglich vorhanden waren. Die Versuche, welche Milroy an dem Nucleoproteïd der Pankreasdrüse anstellte, führten zu dem gleichen

Ergebnis: sowohl bei der Pepsin- wie bei der Trypsinverdauung ging eine Substanz in Lösung, die als Nucleïnsäure charakterisiert werden konnte, und hier erwies sich die Abspaltung von Orthophosphorsäure als ganz minimal.

Diese Ergebnisse Milroys erfuhren eine Bestätigung durch eine mehrere Jahre später (1901) veröffentlichte Untersuchung von Umber[1]), welcher, ebenso wie Milroy, mit dem Nucleoproteïd des Pankreas experimentierte und unter den in Lösung befindlichen Stoffen neben nucleïnsäurefreiem Pepton und den weiteren Abbauprodukten des eigentlichen Eiweisskomplexes Nucleïnsäure in beträchtlicher Menge nachweisen konnte.

Die Frage wurde sodann von Araki[2]) in der Weise weiter untersucht, dass rein dargestellte Nucleïnsäure der Einwirkung des Fermentes unterworfen wurde. Araki wählte zu seinen Versuchen, die er im Laboratorium des hiesigen physiologischen Institutes anstellte, das a-nucleïnsaure Natron. Wie A. Kossel und A. Neumann[3]) im Jahre 1893 fanden, lassen sich aus der Thymusdrüse zwei Formen der Nucleïnsäure darstellen, eine a- und eine b-Säure. Die erstere unterscheidet sich von der letzteren nur dadurch, dass sie schwerer löslich ist und dass ihre Alkalisalze beim Erkalten der wässrigen Lösung eine gelatinierende Masse bilden. Araki sagte sich nun: Wenn die Thymusnucleïnsäure durch Enzym in ähnlicher Weise angegriffen wird, wie die Kernsubstanz der roten Blutkörperchen, deren Auflösung durch verschiedene Fermente auch er beobachtet hatte, so müsste sich

1) Zeitschr. für klin. Med., Bd. 43.
2) Zeitschr. für physiol. Chem., Bd. 38, S. 84.
3) Arch. für Phys. und Anat., Physiol. Abt. 1894, S. 195.

dies zunächst durch eine Verflüssigung der gelatinierenden Masse des a-nucleïnsauren Natrons zu erkennen geben. Und in der Tat konnte Araki diese Verflüssigung durch Einwirkung von Thymus-, Leber-, Milzextrakt, Trypsin und Erepsin konstatieren, wobei die a-Nucleïnsäure zunächst in die b-Säure umgewandelt wurde, während bei länger fortgesetzter Digestion auch die letztere weiter zerlegt wurde. Speziell vom Trypsin sagt er, „dass es spaltend auf die Säure a einwirkt, und dass bei dieser Spaltung die Säure b, resp. Nucleothyminsäure als Zwischenprodukte auftreten, welche nur bei langdauernder Trypsindigestion in grösserem Massstabe weiter zerlegt werden.“ Es ist das unbestrittene Verdienst von Araki, auf diese Weise zuerst festgestellt zu haben, dass die gelatinierende Nucleïnsäure durch fermentative Wirkungen in ein oder mehrere lösliche Produkte umgewandelt werden kann. Eine weitere Frage ist jedoch die, ob das Ferment, welches diese Umwandlung bewirkt, mit dem Trypsin resp. Erepsin identisch ist. Araki hebt es als interessant hervor, dass die eiweissspaltenden Enzyme, im Gegensatz zu den kohlehydratspaltenden, auch Stoffe von so verschiedenartiger Konstitution, wie die Nucleïnsäuren, zu zerlegen im Stande sind. Iwanoff[1]) hingegen meint, dass die Zerspaltung der Nucleïnsäure zu unbedeutend ist, um im Pepsin und Trypsin ein Ferment nicht nur für Eiweiss, sondern auch für Nucleïnzersetzung zu sehen. Daher vermutet er, dass bei der Zersetzung im Organismus ein spezielles Ferment diese Wirkung ausübt. Iwanoff konnte nun aber nachweisen, dass das Mycel von verschiedenen Schimmelpilzen, nämlich Aspergillus niger

1) Zeitschr. für physiol. Chem., Bd. 39.

und Penicillium glaucum, im Stande ist, Nucleïnsäure bis zur Phosphorabspaltung zu zersetzen, und dass die Wirkung auf einem Enzym beruht, da sie nach dem Tode der Pilze fortdauert und durch hohe Temperatur ganz gehemmt wird. Gleichzeitig geht aus seinen Kontrollversuchen mit Mett'schen Gelatineröhrchen hervor, dass dieses nucleïnsäurezersetzende Ferment sehr wahrscheinlich mit dem proteolytischen nicht identisch ist. Eine Stütze für diese Annahme liefern die Versuche von Plenge. Plenge[1]) prüfte das Verhalten verschiedener Bakterien gegenüber dem a-nucleïnsauren Natron. Er fand, dass verschiedene Bakterien die Gallerte verflüssigen, und zwar nicht nur diejenigen, welche Gelatine verflüssigen, sondern z. B. auch Typhus- und Colibazillus, die Gelatine nicht verflüssigen. Daher hält auch er es für berechtigt, die Wirkung einem besonderen Enzyme zuzuschreiben.

Bei unseren Untersuchungen nun stand im Mittelpunkt des Interesses die Wirkung des Trypsin auf a-nucleïnsaures Natron. Und zwar handelte es sich um die Frage, ob es denn tatsächlich das Trypsin, das proteolytische Ferment sei, dem diese Wirkung zuzuschreiben ist, oder ob sie nicht vielmehr auf ein besonderes Ferment, eine Nuclease,[2]) zurückzuführen sei, die sich in den Pankreaspräparaten neben dem Trypsin findet. Die Vermutung, dass hier zwei Fermente im Spiele sind, lag ja, wie aus den angeführten Tatsachen hervorgeht, nahe, zumal es doch unwahrscheinlich erscheint, dass an zwei so wesentlich verschieden gebauten Molekülen, wie dem komplizierten Eiweissmolekül

1) Zeitschr. für physiol. Chem., Bd. 39.

2) Iwanoff will mit Recht diese Bezeichnung für ein das Nucleïnsäuremolekül zerlegendes Ferment vorbehalten wissen.

und dem der Nucleïnsäure sich derselbe Angriffspunkt findet.

Es wurde also mit den folgenden Versuchen beabsichtigt, in der Annahme, dass es sich um zwei verschiedene Fermente handelt, eine Trennung derselben herbeizuführen.

Als Testobjekt dienten in den ersten Experimenten Glasröhrchen mit einem Lumen von etwa 2 mm Durchmesser (Mett'sche Röhrchen), die mit einer in der Wärme flüssigen, bei Zimmertemperatur zu einer vollkommen starren Masse gelatinierenden Lösung von a-nucleïnsaurem Natron gefüllt waren. Das a-nucleïnsaure Natron habe ich genau nach den Angaben von Neumann[1]) hergestellt. Mett[2]) hatte diese Methode in Vorschlag gebracht zur quantitativen Bestimmung der Pepsinwirkung, indem die Röhrchen, mit koaguliertem Eiweiss gefüllt und in die zu untersuchende Flüssigkeit gebracht, durch die Länge des verbrauchten Eiweisszylinders einen Massstab für die Wirkung abgeben sollten. Für unsere Zwecke erwies sie sich aber als ungeeignet. Denn da die gelatinierende Substanz in Wasser wohl löslich ist, so war in Anbetracht ihrer geringen Menge im Verhältnis zu der zu untersuchenden Flüssigkeit eine Auflösung auch nach physikalischen Gesetzen durch Diffusion möglich und konnte nicht mit Sicherheit auf die Fermentwirkung bezogen werden. Zudem schien es nötig, um sich in dieser Beziehung jeglicher Täuschung zu entziehen, grössere Quantitäten als Testobjekt zu verwenden. Denn es konnte so bei eingetretener Verflüssigung nach etwa noch vorhandener gelatinierender Substanz geforscht werden.

1) Arch. für Anat. und Phys., Physiol. Abt. 1898, S. 374. 1899, Suppl. S. 552.

2) Arch. für Anat. und Phys., Physiol. Abt. 1894, S. 68.

Es geschah dies in der Weise, dass das Versuchsgemenge heiss filtriert und dann mit Alkohol und einigen Tropfen Natriumacetatlösung versetzt wurde. Durch diese Reagentien wird das nucleïnsaure Natron aus der wässrigen Lösung als flockiger weisser Niederschlag gefällt, und man kann es dann, wenn man es nach Abfiltrieren der übrigen Flüssigkeit wieder in heissem Wasser auflöst, durch Erkaltenlassen der Lösung als gelatinierende Substanz selbst in geringer Menge noch erkennen.

Es sollte nun zunächst die von Araki beschriebene verflüssigende Wirkung des Trypsin auf a-nucleïnsaures Natron noch einmal festgestellt werden. Dazu wurde folgender Versuch angestellt:

Es wurde verwandt eine 4%ige Lösung von a-nucleïnsaurem Natron, welche bei Zimmertemperatur eine vollkommen starre Masse bildete, während ihre Konsistenz bereits bei etwa 40° C. schwappend oder dickflüssig war, ferner ein Trypsinpräparat (Grübler), welches eine Fibrinflocke in ca. ½ Stunde auflöste. Es wurde zu etwa 4 ccm der in einem Reagenzglase erstarrten Lösung des nucleïnsauren Natrons 1 ccm einer 0,4%ige Natriumcarbonatlösung und etwas Trypsinpulver zugesetzt, darauf diese Mischung in dem Thermostaten bei etwa 40° C. zum Digerieren aufgestellt.

Die Konsistenz war nach 24 Stunden dickflüssig, nach 78 Stunden war eine weitere Verflüssigung zu konstatieren, nach 117 Stunden war die Lösung dünnflüssig. Nach 189 Stunden wurde in der oben beschriebenen Weise die Probe auf Gelatinieren angestellt. Auf Zusatz von Alkohol und Natriumacetat fiel ein Niederschlag aus, der in einer kleinen Menge heissen Wassers gelöst, beim Erkalten gelatinierende Substanz ergab. — Die Probe war also positiv, mithin die Wirkung des

Trypsins, wenn überhaupt vorhanden, unvollständig und die Verflüssigung wohl z. T. auf den Aufenthalt im Thermostaten, z. T. auf den Zusatz von Flüssigkeit zurückzuführen.

Auch bei 3 andern Grübler'schen Trypsinpräparaten, welche ich des weiteren prüfte, konnte ich mich von einer tatsächlich intensiven Verflüssigung, die auf das Ferment zurückzuführen war, nicht überzeugen. Gelatinierende Substanz war immer nachzuweisen, allerdings konnte man schätzungsweise eine Verminderung derselben annehmen.

Wie ich hier bemerken möchte, teilte mir Herr Dr. Steudel mit, dass auch er bei Versuchen, die er bereits vorher angestellt hatte, zu der gleichen Ansicht gekommen war.

Da also das käufliche Trypsinpräparat sich von zu schwacher Wirkung erwies, versuchte ich es mit einer nach Hammarstens Vorschrift aus Rindspankreas erhaltenen Trypsinlösung. Die Versuchsanordnung war die folgende: 1 g nucleïnsaures Natron wurde in dreissig Teilen Wasser in der Wärme gelöst, die Flüssigkeit in zwei gleiche Teile A und B geteilt, nach dem Erkalten Teil A mit einer geringen Menge der Trypsinlösung, Teil B mit der gleichen Menge 0,4% Natriumcarbonatlösung versetzt und nun die beiden Gemenge im Thermostaten der Digestion überlassen. — Beide Proben zeigten sofort nach dem Flüssigkeitszusatz und Umschütteln eine dickflüssige Konsistenz. Nach 5 Tagen war sie bei A eine Spur dünnflüssiger, als bei B. Nach weiteren 4 Tagen wurden beide Teile auf das gleiche Volumen eingeengt, darauf gelatinierten beide, Teil A ein wenig schwächer.

Es war also auch durch die Hammarsten'sche Trypsinlösung nur eine äusserst schwache Wirkung zu konstatieren. Sie fehlte überhaupt bei einem nach der Angabe von Mays dargestellten Pankreasextrakt, auch unter Fortfall der Alkalisierung, wie es sich bei den wiederholt angestellten Versuchen zeigte.

Da bisher durch die Pankreaspräparate keine deutliche Verflüssigung zu erzielen war, wurde nun die Substanz des Pankreas selbst auf diese Fähigkeit hin geprüft. — Wieder kam, wie auch in allen folgenden Versuchen, eine 4% Lösung von a-nucleïnsaurem Natron zur Verwendung. Ebenso ging auch hier, wie im folgenden fast immer, die Digestion im Thermostaten bei ca. 40° C. von statten.

Die Lösung des nucleïnsauren Natrons wurde der Einwirkung des Pankreasbreies unter den eben angegebenen Bedingungen, sowie unter Toluolzusatz ausgesetzt.

Das Ergebnis war nach 24 Stunden eine bis auf die Gewebsfetzen vollständige Verflüssigung. Die Probe auf Gelatinieren war nach weiteren 24 Stunden negativ, d. h. es war durch Filtrieren, Ausfällen, Lösen und Erkaltenlassen keine gelatinierende Substanz nachweisbar. Dieser Versuch wurde mehrfach mit dem gleichen Resultat wiederholt. Meist fiel auf Zusatz von Alkohol und Natriumacetat überhaupt kein Niederschlag aus.

Man konnte jetzt mit Sicherheit den Schluss ziehen, dass die wirksame Substanz im Pankreas tatsächlich vorhanden ist.

Da sich nun der Pankreasbrei als wirksam erwies, die Organextrakte aber nicht, so suchten wir uns durch verschiedene Erwägungen das Fehlen der Wirkung in letzterem Falle zu erklären. Im

wesentlichen waren vier Möglichkeiten gegeben. Es konnte bei der Verarbeitung des Materials die Nuclease in einem Filterrückstand zurückgeblieben sein, oder sie war überhaupt nicht extrahierbar. Ferner: sie war bei dem Bereitungsprozesse irgend welchen zerstörenden Einflüssen erlegen. Schliesslich: ihre Wirkung setzte sich aus zwei Komponenten zusammen, die nun durch unser Zutun künstlich getrennt worden waren. In dieser Überlegung machte ich die folgenden Versuche:

Ich liess nach der Angabe von Mays für die Herstellung des Pankreasextraktes Pankreasbrei unter Wasser und Toluol drei bis vier Tage digerieren. Dann wurde coliert und in dem Colierrückstand nach dem etwa zurückgebliebenen Ferment gesucht:

Versuch A.

Eine kleine Portion von dem Colierrückstand wurde einer Lösung von a-nucleïnsaurem Natron zugesetzt. Nach 160 Stunden war keine Verflüssigung eingetreten.

Versuch B.

Eine Portion von dem Colierrückstand wurde in einer schwach alkalischen Natriumcarbonatlösung aufgeschwemmt und in die Flüssigkeit eine Fibrinflocke gebracht.

Nach zwei Stunden war dieselbe vollkommen aufgelöst.

Aus diesen Versuchen geht hervor, dass der Colierrückstand zwar die Fähigkeit hat, Eiweiss zu verdauen, nicht aber, Nucleïnsäure zu zerlegen.

Dasselbe Resultat ergab sich für das Colierfiltrat.

Hieraus kann man schon schliessen, dass, wenn die Nuclease bei dem beschriebenen

Verfahren nicht überhaupt zerstört worden war, zu ihrer Wirkung zwei Komponenten nötig seien, von denen die eine nun im Colierrückstand, die andere im Colierfiltrat sich befand.

Daher wurden in dem folgenden Versuch beide Teile vereinigt und dann die Lösung des a-nucleïnsauren Natrons der Einwirkung dieses Gemisches ausgesetzt.

Nach 110 Stunden war keine Wirkung zu erkennen, d. h. es war überhaupt nicht mehr auf sie zu rechnen.

Es blieb nun nur noch die einzige Möglichkeit übrig, dass eine Zerstörung des gesuchten Fermentes durch unser Verfahren verursacht war. Um die Unmöglichkeit, dasselbe zu extrahieren, konnte es sich zunächst nicht handeln, da auch der Pankreasbrei nach der Digestion unter Toluol die Fähigkeit, die Gallerte zu lösen, verloren hatte.

Es wurde daher ein anderer Weg eingeschlagen.

Ich stellte einen Pankreaspresssaft her, den ich nach ca. 15stündiger Digestion des Pankreasbreis unter Toluol bei Zimmertemperatur mit Hilfe der Buchner'schen Presse erhielt. Von diesem wurde eine geringe Menge unserer gelatinierenden Substanz unter Hinzufügen von Toluol zugesetzt und einer 24stündigen Einwirkung überlassen.

Nach dieser Zeit war eine völlige Auflösung eingetreten. Die nach weiteren 140 Stunden angestellte Probe auf Gelatinieren fiel negativ[1]) aus.

1) Unter dieser Ausdrucksweise sei hier, wie auch in allen folgenden Fällen, die Unmöglichkeit des Nachweises von gelatinierender Substanz nach der anfangs beschriebenen Methode verstanden.

Derselbe Pankreaspresssaft, mit Natriumcarbonat schwach alkalisiert, löste eine Fibrinflocke bei Zimmertemperatur[1]) in ca. ½ Stunde vollständig auf.

Zur Kontrolle wurde er nun zum Sieden erhitzt und dann die Gallerte des a-nucleïnsauren Natrons seiner Einwirkung ausgesetzt. Nach 72 Stunden war die Masse dünnflüssig. Die bald darauf angestellte Probe auf Gelatinieren fiel positiv aus.

Diese Versuche sagen aus, dass sich im Pankreas tatsächlich ein von der Zelle abtrennbares Ferment vorfindet, welches die Fähigkeit besitzt, die Gelatinierbarkeit des a-nucleïnsauren Natrons aufzuheben.

Warum hatte sich dasselbe aber, abgesehen von den beiden Fällen, in denen wir einmal frischen Pankreasbrei, das andere Mal den Presssaft in Anwendung zogen, und wo seine Wirkung eklatant hervortrat, sonst stets sich unserer Wahrnehmung entzogen? Darüber sollten die folgenden Versuche hinreichende Aufklärung bringen.

Es wurden 50 g Pankreasbrei mit 100 ccm Wasser und 5 ccm Toluol zur Digerierung angesetzt. Von diesem Gemisch wurden nun zwei Proben entnommen, Probe A nach 20 stündiger, Probe B nach 92 stündiger Digestion. Beide Proben wurden sofort nach ihrer Entnahme zu den folgenden Versuchen verwandt.

Versuch A.

Zur Lösung des a-nucleïnsauren Natrons wurde die Probe A hinzugefügt. — Nach 48 Stunden war vollständige Verflüssigung zu konstatieren. Probe auf Gelatinieren nach weiteren 24 Stunden negativ.

1) Sämtliche hier erwähnten Untersuchungen wurden im Sommer angestellt.

Versuch B.

Zur Lösung des a-nucleïnsauren Natrons wurde die Probe B hinzugefügt. Nach 118 Stunden war auch hier vollkommene Verflüssigung zu konstatieren. Die Probe auf Gelatinieren fiel aber nach weiteren 48 Stunden positiv aus, wenn auch die Menge der gelatinierenden Substanz offenbar sich verringert hatte.

Wiederum setzte ich 100 g Pankreasbrei mit 150 ccm Wasser und Toluol an. Nach 17stündiger Digestion bei Zimmertemperatur löste eine Probe von dem Gemisch die Gallerte der Nucleïnsäure in ca. 1 Stunde vollständig. Nach eben diesen 17 Stunden wurde die Masse coliert. Mit den so erhaltenen Fraktionen wurden folgende Versuche angestellt:

Versuch A.

Eine Portion des Colierfiltrates wird zur Lösung des a-nucleïnsauren Natrons hinzugesetzt. — Nach ca. 1 Stunde ist die Masse völlig verflüssigt. Probe auf Gelatinieren negativ.

Versuch B.

Eine Fibrinflocke wird der Einwirkung desselben Colierfiltrates ausgesetzt. — Nach 6 Stunden ist nichts von einer Auflösung derselben zu sehen.

Versuch C.

Eine Portion des Colierrückstandes wird zur Lösung des a-nucleïnsauren Natrons hinzugesetzt. — Nach ca. 1 Stunde ist vollständige Verflüssigung eingetreten. Probe auf Gelatinieren negativ.

Der ganze noch übrige Teil des Colierfiltrates wurde bald nach dem Colieren, also nach etwa 17stündiger Digestion des Pankreasbreies durch

ein Faltenfilter geschickt, und dann das so erhaltene Filtrat auf die Fähigkeit, die Gallerte der Nucleïnsäure zu verflüssigen, geprüft. — Die augenfällige Wirkung konnte nach kräftigem Umschütteln bereits nach wenigen Minuten erkannt werden, indem die Masse nach dieser Zeit total dünnflüssig war. Die Probe auf Gelatinieren fiel negativ aus.

Eine Fibrinflocke wurde unter Zusatz von wenig Natriumcarbonat der Einwirkung desselben Filtrates ausgesetzt. — Nach 6 Stunden war aber nur eine spurenhafte Wirkung zu erkennen.

Aus diesen Versuchen, die übrigens bei den des öftern angestellten Wiederholungen stets durchaus ähnliche Resultate lieferten, geht hervor, dass sich unsere letzte Annahme, nämlich, dass eine Zerstörung des wirksamen Agens durch unser Verfahren eingetreten sein musste, bestätigt hat. Denn wir sehen ja, dass z. B. ein nach 17stündiger Digestion gewonnenes Pankreasextrakt die Wirkung in ausgezeichneter Weise hervorzubringen im Stande ist, während nach 92stündiger Digestion der Pankreasbrei diese Fähigkeit fast vollkommen eingebüsst hat. Gleichzeitig fällt aber auf, dass gerade bei den wirksamen Extrakten, die nach kurzer Digestionszeit erhalten waren, von einer Lösung der Fibrinflocke kaum eine Andeutung vorhanden war, während sie bei den älteren Digestionsextrakten zwar nicht besonders geprüft wurde, aber doch erwartet werden dürfte. Es schien also die Nuclease in der Flüssigkeit zuerst aufzutreten, um dann bei längerer Digestion dem proteolytischen Agens Platz zu machen. Dieser spontane Umschlag in der Wirkungsweise desselben Versuchsgemenges mit der Dauer der Digerierung sollte

durch den folgenden Versuch näher beobachtet werden:

Es wurden 100 g Pankreas mit 200 ccm Wasser und Toluol angesetzt, dann in einzelnen Zwischenräumen Proben von dem Extrakt abfiltriert und auf ihre Wirkungsweise auf eine Fibrinflocke resp. auf das a-nucleïnsaure Natron untersucht. Es sei bemerkt, dass bei der letzteren Prüfung immer soviel von dem Extrakt zugesetzt wurde, als die Menge der Lösung des a-nucleïnsauren Natrons betrug. Das Ergebnis dieses Versuches zeigt am deutlichsten die folgende Tabelle:

Dauer der Digerierung	Bis zur Auflösung der Fibrinflocke verflossene Zeit	Bis zur Verflüssigung der Gallerte des a-nucleïns. Natrons verflossene Zeit
16 Stunden	2—3 Stunden	4—6 Stunden*
18 „	1 Stunde	4—6 Stunden*
22 „	$^3/_4$—$^1/_2$ Stunde	9—10 Stunden**
25 „	20 Minuten	16—18 Stunden***
41 „	20 „	Nach 29 Stunden war die Masse noch vollkommen starr

* Probe auf Gelatinieren negativ.

** Hier konnte ich nach 20 Stunden noch gelatinierende Substanz in ganz geringer Menge nachweisen.

*** Probe auf Gelatinieren nach 45 Stunden positiv.

Man sieht also, dass das auf die Nucleïnsäure einwirkende Agens mit der längeren Dauer der Digerierungszeit seine Wirkungskraft vollkommen eingebüsst hat, während das proteolytisch wirksame Prinzip zwar auch anfangs deutlich zu erkennen war,

später aber an Intensität seiner Wirkung deutlich zugenommen hatte.

Ebenso, wie ich hier ein Trypsinpräparat erhalten habe, das frei von jeder Nucleasenwirkung ist, konnte ich öfters, wie auch in dem früher erwähnten Falle, einen Pankreassaft gewinnen, der die letztere in hohem Masse besass, während ihm die proteolytische vollends fehlte. Nur hatte ich die vollkommene Trennung nicht in meiner Gewalt.

Jedenfalls geht aus allen meinen Versuchen hervor, dass die Nuclease mit dem Trypsin nicht identisch ist. Ebenso ist, wie ich glaube, die beabsichtigte Trennung der beiden Fermente als gelungen zu bezeichnen. Es erklärt sich ferner der scheinbare Widerspruch meiner Beobachtungen mit den Araki'schen Angaben. Denn es geht ja aus unseren Ausführungen hervor, dass es wohl möglich ist, ein Pankreaspräparat zu erhalten, das die Fähigkeit, sowohl Eiweiss, wie auch die Nucleïnsäure zu lösen, in hinreichendem Masse besitzt. Nur ist die Wirkung nicht auf ein und dasselbe Ferment, sondern auf eine Beimengung von Nuclease zum Trypsin zurückzuführen.

Bevor ich diese Betrachtungen schliesse, möchte ich noch auf eine neuerdings erschienene Arbeit kurz zu sprechen kommen, von der ich erst nach Abschluss meiner Untersuchungen Kenntnis erhielt, da sie dazu auffordert, die von uns gewonnenen Resultate besonders kritisch zu beurteilen. — Pawlow war ja schon von jeher der Ansicht, dass Lab und Pepsin identisch seien, dass es dasselbe Ferment sei, welches die proteolytische Wirkung einerseits, die milchcoagulierende andererseits zu Stande brächte.

Durch seine neueren mit Parastschuk gemeinsam angestellten Untersuchungen[1]) ist es ihm nun tatsächlich gelungen, für eine Anzahl bisher von allen Seiten anerkannter Trennungsmethoden einwandsfrei den Beweis der Hinfälligkeit zu liefern, indem er mit angeblich reines Labenzym vorstellenden Präparaten durch geeignete Manipulationen die proteolytische Wirkung wieder hervorzubringen im Stande war. Er nimmt an, dass in den Fällen, wo die Isolierung zweier Fermente scheinbar erreicht war, es sich nur um eine ungünstige Beeinflussung eines und desselben mit beiden Fähigkeiten versehenen Fermentes durch verschiedene Agentien handelt, derart, dass das eine Mal die proteolytische Wirkung, das andere Mal die milchcoagulierende nicht zu Stande kommen kann. In verschiedenen Fällen ist es ihm auch gelungen, die störenden Einflüsse näher zu charakterisieren.

Es ist daher nicht auszuschliessen, dass auch bei unseren Beobachtungen derartige Vorgänge im Spiele waren. Es wäre vielleicht wünschenswert gewesen, eine Trennung durch fraktionnierte Fällung zu erzielen[2]). Aber auch diese Methode hat nach den Pawlow'schen Ergebnissen bezüglich des Labs und Pepsins ihre Beweiskraft eingebüsst. Überhaupt glaube ich aus den Pawlow'schen Ausführungen schliessen zu dürfen, dass eine exakte Beweisführung hinsichtlich der Existenz zweier ver-

1) Zeitschr. für physiol. Chem., Bd. 42, S. 415.

2) In der Tat habe ich auch derartige Versuche angestellt, ohne aber bezüglich der Trennung zu irgend einem Ergebnis gelangt zu sein. Dagegen sei nebenbei erwähnt, dass bei Versetzen eines Pankreasextraktes von starker Nucleasenwirkung mit Ammoniumsulfat das wirksame Prinzip in den Niederschlag überging, während das Filtrat vollkommen frei von jeder Wirkung war.

schiedener Fermente in derselben Flüssigkeit, natürlich aber noch weniger hinsichtlich ihrer Identifizierung nicht möglich ist. In ersterem Falle, wenn die Trennung gelungen ist, werden wir doch nie im Stande sein, auszuschliessen, dass es sich nur um eine scheinbare handelte. Denn wir können nicht wissen, ob alle Möglichkeiten erschöpft sind, die geeignet wären, um in der angeblich nur in einem Sinne wirksamen Fermentflüssigkeit die andere Wirkung wieder wach zu rufen. Andererseits ist durch den Nachweis der Hinfälligkeit sämtlicher bekannter Trennungsmethoden für zwei angeblich verschiedene Fermente nicht mehr als eben diese Tatsache festgestellt. Denn es könnten ja zwei verschiedene Fermente in derselben Flüssigkeit existieren, nur ihre Isolierung brauchte uns auf keine Weise zu gelingen.

Aber so unmöglich auch die Beweisführung in diesem Sinne ist, ebenso falsch wäre es, unseren heutigen Kenntnissen von den Fermenten entsprechend, sie erzwingen zu wollen. Denn ein Ferment ist ja für uns nichts Fassbares. Wir erkennen es nur an den Wirkungen, die es ausübt und an den Einflüssen, denen es unterliegt; wir sind gewohnt, die einzelnen Fermente durch die diesbezüglichen Abweichungen von einander zu charakterisieren und werden demnach je nach Fehlen oder Vorhandensein derartiger Charakteristika in der Lage sein, von der Existenz eines einzigen oder zweier verschiedener Fermente sprechen zu dürfen.

Nun sehen wir ja Pepsin und Lab unter natürlichen Bedingungen meist vergesellschaftet auftreten, und Pawlow und Parastschuk konnten ebensowohl bei frischem unverändertem Magensaft, wie auch unter mannigfachen künstlichen

Modifikationen meist einen parallelen Verlauf der beiden Wirkungen konstatieren. Gelegentlich allerdings beobachtete Abweichungen suchten sie, wie ich glaube, in nicht ganz überzeugender Weise durch die verschiedene Empfindlichkeit der in Betracht kommenden Reaktionen zu erklären. Jedenfalls hat durch ihre Ausführungen die von Pawlow verfochtene Ansicht, dass Lab und Pepsin identisch seien, eine bedeutende Stütze erhalten, hauptsächlich durch den für die bisher anerkannten Trennungsmethoden erbrachten Beweis der Hinfälligkeit.

Ich glaube aber nicht, dass wir ihre Erfahrung auf den für uns in Betracht kommenden Fall übertragen dürfen. Denn einerseits ist der Angriffspunkt der beiden Fermente hier ein ganz verschiedener, andererseits ist von einem parallelen Verlauf der Wirkung nichts konstatiert worden, im Gegenteil, es ergab sich die merkwürdige Tatsache, dass unter Bedingungen, die die natürlichen Verhältnisse möglichst zu bewahren geeignet erschienen, die aus der Tabelle ersichtlichen Wirkungsreihen gerade sich kreuzten. Leider hatte ich keine Gelegenheit, das Pankreassekret auf seinen Gehalt an Nuclease zu prüfen, was natürlich von grosser Wichtigkeit wäre. Es ist aber wohl zu vermuten, dass das Ergebnis negativ ausgefallen wäre.

Für alle Fälle glaube ich, sowohl aus der durchaus verschiedenen Wirkungsweise, sowie aus dem gerade entgegengesetzten Verhalten unter gleichen Bedingungen schliessen zu müssen, dass das Trypsin mit der Nuclease nicht identisch ist, und ich nehme auch an, dass in den andern Fällen, wo man eine Zerlegung der Nucleïnsäure durch andere proteolytische Fermente nachgewiesen zu haben glaubte, es sich ebenfalls um die Wirkung eines besonderen Fermentes, einer Nuclease, gehandelt hat.

Ob die Nucleïnsäure nun tatsächlich bei der Verflüssigung der Gallerte durch unser isoliertes Ferment zersetzt wird, darüber konnte ich noch keine Versuche anstellen. Es geht aber, glaube ich, aus einer Beobachtung, die ich machte, mit Sicherheit hervor. In fast allen Fällen nämlich, in denen ich die Probe auf Gelatinieren als negativ bezeichnet habe, fiel bei Zusatz von Natriumacetat und Alkohol überhaupt kein Niederschlag mehr aus, was doch bei Anwesenheit von b-Nucleïnsäure zu erwarten gewesen wäre. Es musste also eine tiefgreifende Zersetzung stattgefunden haben.

Die vorstehenden Untersuchungen wurden im Sommer 1904 im Laboratorium des physiologischen Institutes zu Heidelberg angestellt. Herrn Prof. Dr. Kossel, der mir die Anregung zu dieser Arbeit gab und mich bei ihrer Ausführung in entgegenkommendster Weise unterstützte, spreche ich hierfür den wärmsten Dank aus, ebenso Herrn Privatdozenten Dr. Steudel für seine wertvollen Ratschläge.

Lebenslauf.

Ich wurde am 22. Mai 1881 zu Kattowitz als Sohn des damaligen Kaufmanns, jetzt in Berlin lebenden Rentiers E. Sachs geboren. Meine Schulbildung genoss ich zunächst an der Mittelschule und dem Gymnasium meiner Vaterstadt, sodann an dem Johannes-Gymnasium zu Breslau, schliesslich an dem Kgl. Wilhelms-Gymnasium zu Berlin, von dem ich Ostern 1900 das Zeugnis der Reife erhielt. Ich widmete mich nun dem Studium der Medizin an den Universitäten Freiburg, Berlin und Heidelberg, bestand Ostern 1902 in Berlin das Tentamen physicum und legte im Wintersemester 1904/05 zu Heidelberg die ärztliche Staatsprüfung ab. Während dieser meiner Studienzeit hatte ich Gelegenheit, die Vorlesungen und Kurse folgender Herren Professoren und Dozenten zu hören:

Arnold, B. Baginsky, Bettmann, Blumenthal, Borchardt, O. Cohnheim, V. Czerny, Engelmann, Engler, Erb, Emil Fischer, Fritsch, Göppert, Gottlieb, Gusserow, v. Hansemann, O. Hertwig, Himstedt, v. Hippel, Jacoby, O. Israel, Keibel, Kiliani, G. Klemperer, Knauff, Koblanck, Koenig, Kopsch, A. Kossel, Fr. Kraus, L. Landau, Leber, Lesser, L. Lewin, Lexer, Lossen, Mendel, v. Michel, Oestreich, Orth, v. Rosthorn, Schottlaender, F. E. Schulze, Schwalbe, Senator, Steudel, Strauss, Thierfelder, Vierordt, Waldeyer, Warburg, Wassermann.

Allen diesen Herren, meinen hochverehrten Lehrern, bin ich zu grossem Danke verpflichtet.